小鼠腹腔巨噬细胞被S-O_2-1激活后的抑瘤作用

Ⅰ. 小鼠腹腔巨噬细胞的体外细胞毒作用及扫描电镜观察

俞吉安 李君璎
(复旦大学生物系免疫组 上海)

关键词 巨噬细胞 细胞毒作用 抑瘤效应 微生物佐剂

在六十年代Mathe就用卡介苗来治疗小儿白血病，并获得了良好的效果。以后人们开始重视如何利用微生物佐剂刺激机体的防御机制，增强机体对肿瘤的排斥能力，来达到提高肿瘤治疗效果的目的。

如今卡介苗和短小棒状杆菌已作为常用的微生物佐剂，它们在肿瘤免疫治疗中的作用得到了肯定，但也存在着一些不良的副作用。为进一步减小毒性，提高疗效，许多研究者正在从事提取它们的有效成分或筛选其他具有抗肿瘤活性，副作用小的菌株。

S-O_2-1细菌是由卫生部上海生物制品研究所分离的一株需氧的非致病的革兰氏阴性菌。在动物试验中发现用S-O_2-1制成的菌苗制品能激活小鼠的单核—吞噬细胞系统，对接种艾氏腹水癌的小鼠有较高的保护作用（叶庆祯等，1983）。并且自81年来在有关单位的临床使用中，观察到它副作用小，安全性大，对乳腺癌、胃癌、恶性肉芽肿等多种癌症均有一定疗效，特别对肺癌伴有的癌性胸水的消退疗效更好。

为了给临床应用提供可靠的理论依据，本实验利用同位素示踪技术测定了正常小鼠及经S-O_2-1菌苗激活的小鼠腹腔巨噬细胞在体外对S_{180}肿瘤细胞的细胞毒效应，并且在扫描电镜下，观察了巨噬细胞与肿瘤细胞接触不同时间后的形态变化，从而进一步探讨了该菌苗的抗肿瘤作用的机理。

材 料 与 方 法

小鼠 品系为C57BL/6，体重为18—22克，健康的雄性小鼠。

肿瘤 小鼠S_{180}肿瘤细胞，由纯系小鼠C57BL/6腹腔传代，每周一次。

本文1983年12月9日收到，1984年5月2日收到修改稿。
本研究由中国科学院科学基金资助。

S-O_2-1 菌苗的制备　卫生部上海生物制品所提供菌株，由本实验室制备成细菌悬液，甲醛灭活。菌苗最终浓度为34亿/ml，含甲醛十万分之一。

细胞培养液　含10%小牛血清（FCS）的RpmI 1640(日本、日水制薬株式会社)，每毫升含100单位青霉素和100微克链霉素。

腹腔巨噬细胞细胞毒效应的测定　（Hanazawa *et al.*, 1978)

1.靶细胞悬液制备　从带 S_{180} 腹水瘤小鼠腹腔中吸出肿瘤细胞，用含5%FCS的Hanks液洗涤二次后，悬浮于细胞培养液中，调整浓度至 5×10^5/ml。

2.腹腔巨噬细胞的制备　经0.25ml（8.5亿）S-O_2-1 菌苗腹腔免疫不同天数后，用含20单位/ml肝素的Hanks液收集小鼠腹腔渗出细胞。对照组取正常小鼠腹腔细胞，调整浓度至 5×10^6/ml，吸数毫升至小组织培养并中（根据每组贴壁粘附细胞数量的多少注入不同毫升的腹腔细胞悬液），37°C孵育2小时后，用含5%FCS的Hanks液冲洗三次，去除非粘附细胞，再用橡皮扫轻轻刮下粘附细胞，制备成浓度为 5×10^6/ml的巨噬细胞悬液。

3.细胞毒试验　将1ml靶细胞悬液（5×10^5/ml）加至含 5×10^6 巨噬细胞培养液中，再加入2ml细胞培养液，在37°C 5%CO_2条件下，培养24小时后，再加入0.6μCi H^3—TdR（北京原子能研究所），继续培养21小时后，离心所得的沉淀细胞用去离子水破裂，然后，将细胞破碎物抽滤转移至玻璃纤维滤纸上，干燥后，置甲苯闪烁液中，由Beckman自动液闪仪计数C·P·M，每次分析样品，采用双份平行测定，然后取其平均值来计算细胞毒效应。

$$细胞毒\% = \left(1-\frac{效应细胞+靶细胞C\cdot P\cdot M}{单独靶细胞C\cdot P\cdot M}\right)\times100\%$$

扫描电镜样品制备　在置有盖玻片的组织培养并中，加入数毫升巨噬细胞悬液，然后以10：1比例吸入肿瘤细胞，在37°C 5%CO_2条件下分别培养8、24、36小时后取出盖玻片，用生理盐水漂洗后，再经戊二醛、锇酸双固定，酒精逐级脱水，再浸入醋酸异戊酯，经临界点干燥，离子镀膜机镀金，用日立S_{450}扫描电镜观察。

结　果

经菌苗免疫后不同时间收获的巨噬细胞应显示对靶细胞不同程度的细胞毒效应，为了掌握最佳免疫时间，本实验利用同位素 H^3—TdR 在肿瘤细胞增殖过程中掺入其DNA合成的示踪技术对细胞毒效应进行了动态分析，实验结果表明：

（一）S-O_2-1菌苗免疫4天后所收集的巨噬细胞对 S_{180} 肿瘤细胞就显示了一定的细胞毒作用，免疫后10天，其细胞毒效应最强，以后又下降。正常的小鼠腹腔巨噬细胞也有较弱的细胞毒效应。

每次实验根据菌苗免疫时间的不同分四组加上对照组共五组，每组取3只小鼠腹腔巨噬细胞，效应细胞与靶细胞之比（E/T）为10：1进行细胞毒试验。表1中数据为重复实验4次所计算的 $\overline{X}\pm SD$。

（二）巨噬细胞细胞毒效应与E/T比值的关系：

Table 1　The Kinetics of cytotoxicity of activated macrophages

Source of macrophages	Time of vaccination (days)	Cytotoxicity (%)
Immunized mouse	-4	45±3.8
Peritoneal macrophages	-7	50.9±6.3
	-10	73.6±3.0
Normal mouse	-14	55.5±0.5
Peritoneal macrophages		30.9±0.7

为了进一步明确正常的与激活的巨噬细胞细胞毒效应的差异，我们分析了效靶细胞比值的变化对细胞毒效应的影响。实验结果表明，正常小鼠的腹腔巨噬细胞在体外对S_{180}肿瘤细胞亦有一定的自然细胞毒效应，并随着效应细胞与靶细胞之间的比值增大而增强，但相应比菌苗激活的巨噬细胞的细胞毒效应弱得多。当E/T为10：1时激活的巨噬细胞细胞毒作用达76.2±0.9%，而在此E/T比值下，正常的巨噬细胞的自然细胞毒效应仅25.8±1.6%。当E/T为40：1时，靶细胞的增殖几乎完全被激活的巨噬细胞所抑制（细胞毒效应可达95.5±2.1%）

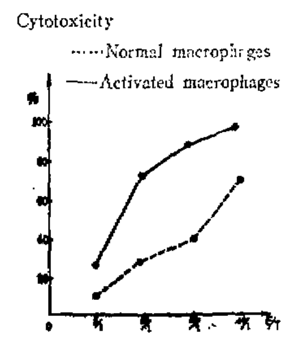


Fig.1. The Effect of Various E/T Ratio on Cytotoxicity

每次实验分激活组与正常组二组，每组取5只小鼠腹腔巨噬细胞进行实验，图中表示数值为五次实验计算的平均值。

Table 2　The effect of trypan blue on cytotoxicity of activated macrophage

No.of tests	Cytotoxicity of activated macrophages	The cytotoxicity of activated macrophages after treatment of trypan blue
1	74.9	20.1
2	75.7	26.6
3	76.1	25.3
4	75.0	18.1
$\overline{X}$±SD	75.4±0.6	22.5±4.0

n = 4　　Pvalue<0.001

（三）台盼兰对巨噬细胞细胞毒效应的影响

为了确定在本实验系统中效应细胞是巨噬细胞，我们测定了巨噬细胞溶酶体抑制剂——台盼兰对效应细胞细胞毒效应的影响。

每次实验分二组，激活组及台盼兰处理组。每组取3只小鼠的腹腔巨噬细胞进行试验。台盼兰处理组，实验前10天用菌苗免疫小鼠，然后在实验前24小时，每鼠腹腔注射0.5mg台盼兰，试验当日取小鼠腹腔巨噬细胞进行细胞毒试验。实验结果表明，台盼兰处理后，效应细胞丧失了大部分对靶细胞的细胞毒效应，进一步肯定了效应细胞为巨噬细胞。

（四）扫描电镜观察

S_{180}肿瘤细胞在生长良好的情况下，表面复盖着一层致密的短绒毛（图2）。当激活的巨噬细胞与肿瘤细胞接触8小时后，可看到靶细胞粘附于巨噬细胞上的情况，但S_{180}肿瘤细胞不发生形态的变化（图3）。接触24小时后，肿瘤细胞发生变形，表面绒毛消失，变得光滑（图4）。接触36小时后，肿瘤细胞表面出现空洞，胞浆外溢，细胞裂解



Fig. 2. S_{180} Tumor cells × 6800 Sem
The tumor cell surface is densely covered with fairly uniform microvilli



Fig. 3. Interaction of activated macrophage and tumor cells (8 hours culture) × 8000 Sem
activated macrophage came into contact *with tumor cell, no morphalogic change on* the surface of tumor cell

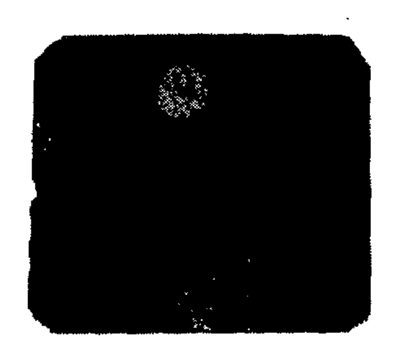


Fig. 4. Interaction of activated macrophage and tumor cell (24hours culture) × *8000* Sem
The tumor cell surface had lost its microvilli and became smooth

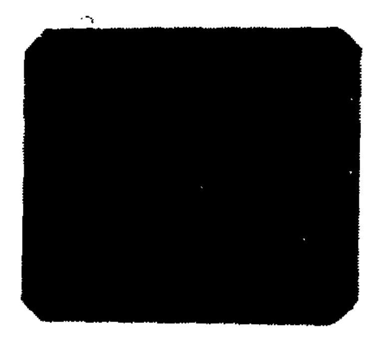


Fig. 5. Interaction of activated macrophage and tumor cell (36 hours culture) × 20000 Sem
The surface of tumor cell showed some pores

（图5）。也见到了几个巨噬细胞对肿瘤细胞作用而造成肿瘤细胞严重变形而死亡的情况（图6）。

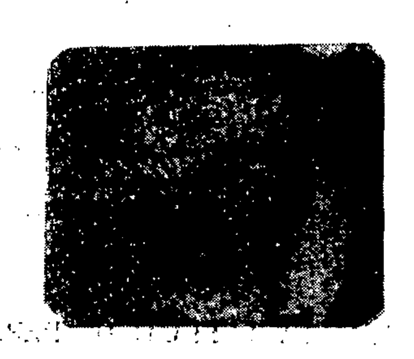


Fig.6. Interaction of activated macrophages and tumor cell (36 hours culture) × 5600 Sem
Three activated macrophages surrounded a dead tumor cell. The surface of the tumor cell displayed severe pittings.

讨　论

近十几年来，许多文章报道了巨噬细胞能通过多种机制来干扰肿瘤细胞的增殖和杀伤肿瘤细胞（Hibbs *et al*., 1974; Nathan *et al*., 1979; Adams *et al*., 1980; Key *et al*., 1981）。但在正常情况下，它的细胞毒效应是较弱的，只有它被激活后，才能发挥其最大的生物功能。目前，大多数人认为卡介苗和短小棒状杆菌是激活巨噬细胞很好的生物佐剂，它们的抗肿瘤活性部分是通过巨噬细胞作用而实现的（Meltzer *et al*., 1975; Gupta *et al*., 1978）。

本文证明了经 S-O$_2$-1 菌苗激活的巨噬细胞对肿瘤细胞有极显著的细胞毒效应，而正常的巨噬细胞自然细胞毒作用很弱。当E/T为10:1时二者差异最为显著，激活的巨噬细胞是正常巨噬细胞细胞毒效应的3倍。并且在扫描电镜下观察到激活巨噬细胞与S$_{180}$肿瘤细胞紧密接触后，肿瘤细胞逐渐受损的过程。因此认为巨噬细胞一方面可以通过和肿瘤细胞直接接触后，将自身的溶酶体释放至肿瘤细胞，将其杀死(Hibbs et al., 1974)。另一方面也可以释放各种细胞毒素，干扰素溶菌酶等活性物质来抑制肿瘤细胞的增殖和杀伤肿瘤细胞（余贲等，1980）。

本实验从功能和形态二方面研究了巨噬细胞的抗肿瘤作用，实验的结果表明了菌苗的抗癌活性和提高巨噬细胞对肿瘤细胞的细胞毒效应是密切相关的。激活巨噬细胞在体内的抑瘤效应有待进一步研究。

参 考 文 献

叶庆祯等　1983　S-O$_2$-1菌苗的免疫效应和抗肿瘤活性。上海免疫杂志 3(1):41

余贲等，1980　国外医学（免疫分册）(1):18

Adams D. *et al*. 1980 Effector mechanisms of cytolytically activated macrophage, Ⅱ: Secretion of a cytolytic factor by activated macrophage and its relation-ship to secreted neutral proteases. *J. Immunol*., 124(1):293

Gupto. D.,*et al*. 1978 Corynebacterium Parvum-induce resistence to a methy lchotanthrene fibrosarcoma.

J. Reticuloendothelial. Soc., 23(1): 1

Hanazawa, S., *et al* 1978 Kinetics and Mechanisms of macrophage activation by Corynebacterium anaerobium. Microbiol. Immunol., 22(3):155

Hibbs, J. B., *et al*. 1974 Heterocytolysis by macrophage activated by Bcg. *Science*. 184: 468

Key, M., *et al*. 1981 macrophage-mediated antibody-dependents destruction of tumour cells in DBA/2 mice in vitro idetification of situ mechanism *J. Natl. cancer. inst.*, 66:103

Meltzer, M. S., *et al*. 1975 Interaction of BCG-activated macrophage with neoplastic and non-neoplastic cell lines invitro: cinemicrographic analysis. *cell. Immunol.*, 17:30

Nathan, C. F., *et al*. 1979 Extr cellular cytolysis by activation macrophages and granulocytes: I. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity *J. Exp. Med.*, 149:100

INHIBITORY EFFECTS OF PERITONEAL MACROPHAGES OF MICE ACTIVATED BY S-O_2-1 BACTERIAL VACCINE ON S_{180} TUMOR CELLS

I. The cytotoxic effect and scanning electron microscopic observation

Yu Jian Li Junying

(Immunology Group Biology Department of Fudan University Shanghai)

The cytotoxic effect of activated peritoneal macrophages of mice on S_{180} tumor cells was studied with the technique of ^{3}H-TdR assay. The activated macrophages had more toxic effect than that of normal mice. Scanning electron microscopic observation showed that at the beginning, S_{180} tumor cells came into contact with the peritoneal macrophages on the surface without any morphologic change. After 24 hrs the tumor cells lost their microvilli and then displayed some surface pittings. There was a close relationship between the cytotoxic effect of activated macrophages and the antitumor activity of the S-O_2-I bacterial vaccine.

Key words Macrophage Cytotoxicity
Inhibitory effect
Bacterial adjuvant